

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1985

Внимание! Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

Voprosy meditsinskoj khimii

ISSN 0042-8809

1985

Attention! OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

ТОМ XXXI

ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ
МЕДИЦИНСКОЙ
ХИМИИ



МОСКВА. МЕДИЦИНА. 1985



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)	ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)	ТАРАҚУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)	ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)	УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)	ШАПОТ В. С. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)	ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)	ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

Адрес редакции журнала:

Москва, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

1983

3. Златопольский А. Д., Зыкова Т. А., Локшина Л. А. и др. — Биохимия, 1984, т. 49, № 9, с. 1128—1132.
4. Локшина Л. А., Рифтина Ф. Д., Орехович В. И. — Там же, 1976, т. 41, № 8, с. 1412—1414.
5. Локшина Л. А., Гуреева Т. А., Орехович В. И. — Там же, 1979, т. 44, № 2, с. 264—271.
6. Локшина Л. А., Гуреева Т. А., Лубкова О. И. и др. — Там же, 1982, т. 47, № 8, с. 1299—1307.
7. Локшина Л. А., Егорова Т. П., Орехович В. И. — Там же, 1983, т. 48, № 6, с. 951—957.
8. Локшина Л. А., Тарханова И. А., Лубкова О. И. и др. — Бюл. экспер. биол., 1983, № 10, с. 50—52.
9. Gray W. — Meth. Enzymol., 1972, v. 25, p. 121—138.
10. Persh L. B., Mekelvy J. F. — J. Neurochem., 1981, v. 36, p. 171—178.
11. Jarvinen M., Hopsu-Navi V. K. — Acta chem. scand., 1975, v. 29-B., p. 772—780.
12. Kirschke H., Langner J., Wiederanders B. et al. — Acta biol. med. germ., 1977, Bd 36, S. 185—189.
13. Kregar J. P., Locnikar T., Popovic A. et al. — Ibid., 1981, Bd 40, S. 1433—1438.
14. Mason R., Taylor M., Etherington D. — FEBS LETT., 1982, v. 146, p. 33—36.
15. Najjar V. A. — In: The Reticuloendothelial System. New York, 1980, v. 2, p. 45—71.
16. Perez H., Ohtani O., Banda D. et al. — J. Immunol., 1983, v. 131, p. 397.
17. Schwartz W. N., Barrett A. J. — Biochem. J., 1980, v. 191, p. 487—497.
18. Singh H., Kalnitsky G. — J. biol. Chem., 1980, v. 255, p. 369—374.
19. Towatari T., Tanaka K., Yoschikawa D. et al. — J. Biochem. (Tokyo), 1978, v. 84, p. 659—671.
20. Yokota K., Shono F., Yamamoto S. et al. — Ibid., 1983, v. 94, p. 1173.
21. Zvonar—Popovic T., Lah T., Kregar J. et al. — Croat. chem. Acta, 1980, v. 53, p. 509—517.

Поступила 23.05.84

STUDY OF PROPERTIES AND SPECIFICITY OF CATHEPSIN II FROM BOVINE SPLEEN

L. A. Lokshina, O. N. Lubkova,
T. A. Gureeva, V. N. Orekhovich

Institute of Biological and Medical Chemistry,
Academy of Medical Sciences of the USSR,
Moscow

Action of cathepsin II from bovine spleen on tuftsin, enkephalin, the oxidized B chain of insulin and a variety of synthetic substrates was studied. Cathepsin II splits off only one N-terminal amino acid from each tuftsin and enkephalin, which, according to the literature, led to inactivation of peptides. The enzyme acts on the oxidized B chain of insulin as an aminopeptidase: it splits off the N-terminal phenylalanine and the centrally located bond(s). K_m and V_{max} for the cathepsin II catalyzed hydrolysis of LeuNA, ArgNA, LysNA and BANA were determined. Substrates with the free NH₂ group were hydrolyzed at a higher rate. Based on the data obtained and the previously reported results on conversion of kallidin into bradykinin, the specificity of cathepsin II and its possible biological functions were discussed. Cathepsin II appears to participate in formation and inactivation of physiologically active peptides. Using the antiserum to spleen cathepsin II it was found that liver, kidney and lung tissues contained the enzymes identical and/or partially identical to cathepsin II from spleen. The data on the properties of cathepsin II from various sources are summarized.

УДК 615.355:577.152.1].017:915.277.3].012.8:]582.282-119: 577.152.1

С. Х. Хадуев, Е. В. Лукашева, И. П. Смирнова, Т. Т. Березов

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ ИЗ TRICHODERMA sp.

Кафедра биохимии Университета дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва

Исключение из диеты животных с перевивными опухолями L-лизина (как и любой другой незаменимой аминокислоты) приводит к торможению роста опухолей и увеличению продолжительности жизни животных [7, 14]. Эти и некоторые другие результаты побудили исследователей к поиску ферментов, катализирующих необратимый распад незаменимых аминокислот и соответственно снижающих концентрацию их до минимального уровня, а также к применению чистых фермент-

ных препаратов в лечении опухолевых заболеваний животных и человека [1, 3, 4, 10—13].

Одним из таких ферментов, перспективных в проблеме энзимотерапии опухолей, является L-лизин- α -оксидаза, который катализирует окислительное дезаминирование L-лизина с образованием α -кето- ϵ -аминокапроновой кислоты, аммиака и перекиси водорода.

Указанная реакция в тканях животных не имеет места, поскольку аналогичного фермента не обнаружено, а

оксидаза L-аминокислот недостаточно специфична по отношению к L-лизину. Кроме того, образующееся α -кетопроизводное L-лизина спонтанно циклизуется в Δ -пирролидонкарбоновую кислоту, которая в силу пространственного расположения не может выполнять функциональных групп функций акцептора аминогруппы в реакциях транс-аминирования аминокислот. Этими обстоятельствами может быть объяснена необратимость приведенной выше реакции окислительного дезаминирования L-лизина при введении в организм животных извне фермента, катализирующего распад этой аминокислоты [1].

Нами ведутся систематические исследования по подбору продуцентов L-лизин- α -оксидазы среди микроорганизмов, разработке методов культивирования штамма-продуцента и методов очистки и получения гомогенных ферментов препарата.

Впервые L-лизин- α -оксидазу в чистом виде получили Soda и соавт. [9] в 1979 г. из экстрактов гриба *Trichoderma viride* штамм v-244-2. Этими же авторами [10] был показан тормозящий рост-эффект на культуре лейкозных клеток L-5178 Y. Предложенный японскими исследователями метод выделения L-лизин- α -оксидазы из культуры *Trichoderma viride* [9] включает в себя 6 стадий очистки с конечным выходом фермента 8%. Поскольку этот метод является громоздким, а штамм культуры недоступным, в нашей работе была поставлена задача разработать новый усовершенствованный метод получения L-лизин- α -оксидазы из отечественного штамма *Trichoderma sp.* В связи с тем что применение этого фермента в клинической онкологии представляется перспективным, весьма интересным было исследовать не только физико-химические его особенности, но и биологические свойства.

Методика

В качестве ионообменных смол в работе были использованы ДЕАЕ-целлюлоза («Reanal», Венгрия), ДЕАЕ-сефацел («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция) и ультрагель АсА-34 («Pharmacia Fine Chemicals»), в качестве реактивов—ортодианизидин («Олайн», СССР), L-лизин («Олайн»), пероксидаза из хрена («Reanal») и яичный альбумин («Fluka», Швейцария).

В работе использовали штамм *Trichoderma sp.* полученный из коллекции культуры кафедры низших растений МГУ

им. М. В. Ломоносова; штамм был отобран при изучении культур рода *Trichoderma* как высокоактивный штамм—продуцент фермента L-лизин- α -оксидазы. Посевной материал выращивали на среде Чапека, а затем культивировали по ранее описанному методу [5, 9].

Активность L-лизин- α -оксидазы определяли по приросту концентрации перекиси водорода в полной реакционной смеси. Стандартные опытные пробы (объемом 2 мл) содержали 1,7 мл раствора ортодианизидина в 0,1 М натрийфосфатном буфере рН 7,4 ($1,9 \times 10^{-4}$ М), 0,2 мл раствора L-лизина (9×10^{-3}), 0,05 мл раствора пероксидазы из хрена ($1 \cdot 10^{-5}$) и 0,05 мл раствора, содержащего фермент.

За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль перекиси водорода в 1 мин. Ферментативную активность определяли на спектрофотометре (VSU2P, ГДР) при λ 460 нм. Белок находили по Лоури [11], используя в качестве стандарта яичный альбумин («Fluka»). Концентрацию белка при очистке фермента оценивали также по величинам оптической плотности при λ 280 нм проб, полученных с колонок. Удельную активность фермента выражали числом единиц активности на 1 мг белка.

Все операции по выделению и очистке L-лизин- α -оксидазы проводили в холодной комнате при температуре 0—5 °С. Центрифугирование экстрактов осуществляли на центрифуге К-70 (ГДР) при $5 \cdot 10^3$ об/мин в течение 40 мин.

Результаты и обсуждение

I стадия очистки. Фракционированное осаждение сульфатом аммония.

Поскольку при использовании таких методов очистки ферментов, как ионообменная хроматография и гель-фильтрация, большое значение имеет состав среды (рН, ионная сила, концентрация белка), возникает необходимость в проведении предварительного диализа или обессоливания исходного раствора или экстракта культуры микроорганизмов. Для такого широко распространенного метода очистки, как фракционированное осаждение сульфатом аммония, состав среды не имеет существенного значения, и поэтому указанный метод был применен на начальных стадиях очистки L-лизин- α -оксидазы.

Исходным материалом для выделения L-лизин- α -оксидазы служил сравнительно большой объем водного экстракта культуры гриба *Trichoderma sp.* Метод фракционированного осаждения сульфатом аммония позволил существенно уменьшить рабочий объем, что создало дополнительные удобства при проведении дальнейшей очистки. Уже на этой ста-

дни очистки удалось отделить балластные вещества, загрязняющие носители, используемые при хроматографии. В работе был проведен поиск оптимальных условий очистки фермента фракционированным осаждением сульфатом аммония.

Показано, что при добавлении в раствор фермента сульфата аммония до 35% насыщения, весь фермент остается в надосадочной жидкости, а в осадок выпадают лишь балластные белки. Добавление сульфата аммония до 50—55% насыщения приводит к частичному осаждению фермента. И лишь при 60% насыщении большая часть фермента (91%) выпадает в осадок. Поэтому при фракционированном осаждении фермента сульфатом аммония использовали концентрации последнего 35—60%. К 1600 мл водного экстракта гриба *Trichoderma harzianum* Rifai с исходной удельной активностью 0,33% Е/мл добавляли при перемешивании сульфат аммония до 35% насыщения, затем центрифугировали раствор и удаляли осадок. К надосадочной жидкости (1200 мл) добавляли сульфат аммония до 60% насыщения и образовавшийся осадок отделяли центрифугированием; последний растворяли в 72 мл натрийфосфатного буфера, рН 7,4 и диализовали против того же буфера.

После данной стадии очистки удельная активность фермента превышала исходную в 11 раз.

II стадия очистки. Ионообменная хроматография на ДЕАЕ-целлюлозе.

Выбор ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе обусловлен тем, что фермент имеет рI в зоне рН 4,0, а при рН 7,4 он заряжен отрицательно и соответственно адсорбируется на анионообменниках.

Полученный после I стадии очистки раствор объемом 110 мл с удельной активностью 3,6 Е/мг постепенно наносили на колонку с ДЕАЕ-целлюлозой, предварительно уравновешенную 0,02 М натрийфосфатным буфером рН 7,4. После тщательного промывания колонки сначала 0,02 М натрийфосфатным буфером рН 7,4, а затем буферным раствором, содержащим возрастающие концентрации хлористого натрия (0,2 М — 0,6 М), элюировали с колонки (рис. 1). Фракции, в которых удавалось определить активность фермента, объединяли, насыщали сульфа-

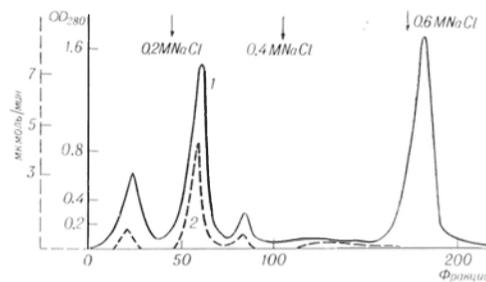


Рис. 1. Ионообменная хроматография L-лизин- α -оксидазы на ДЕАЕ-целлюлозе.

Здесь и на рис. 2 и 3: 1 — оптическая плотность при 280 нм; 2 — активность L-лизин- α -оксидазы (в μ кмоль H_2O_2 в 1 мин). Размер колонки 4×26 см; скорость элюирования 100 мл/ч.

том аммония до 70% и подвергали диализу против 0,02М натрийфосфатного буфера рН 7,4.

Удельная активность после II стадии очистки возросла в 1,9 раза.

III стадия очистки. Ионообменная хроматография на ДЕАЕ-сефацелле.

Поскольку при хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе имела место недостаточно полная очистка фермента, мы сочли целесообразным провести также ионообменную хроматографию на ДЕАЕ-сефацелле, обладающем высокой разрешающей способностью и хорошими гидродинамическими свойствами.

Раствор фермента после диализа (198 мл) с удельной активностью 6,7 Е/мг количественно перенесли на колонку с ДЕАЕ-сефацеллем. Предварительно колонку промывали 0,2М натрийфосфатным буфером рН 7,4. Путем создания ступенчатого градиента хлористого натрия элюировали фермент с колонки (рис. 2).

Удельная активность после данной стадии очистки увеличилась в 2 раза. Фракции, в которых удавалось оп-

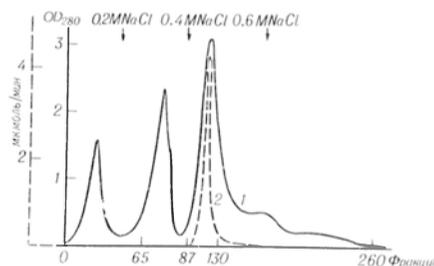


Рис. 2. Ионообменная хроматография L-лизин- α -оксидазы на ДЕАЕ-сефадексе.

Размер колонки $1,5 \times 30$ см; скорость элюирования 10 мл/ч.

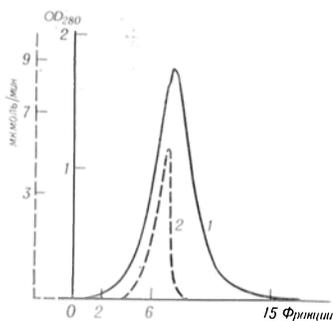


Рис. 3. Гель-фильтрация L-лизин- α -оксидазы на ультрагеле АсА-34.

Размер колонки 1×100 см; скорость элюирования 10 мл/ч.

ределить ферментативную активность, объединяли и насыщали сульфатом аммония на 70%. После центрифугирования осадок растворяли в 0,02М натрийфосфатном буфере pH 7,4. Конечный объем раствора фермента перед IV стадией очистки составлял 1,8 мл. Удельная активность — 14,8 Е/мг.

IV стадия очистки. Гель-фильтрация на ультрагеле АсА-34.

С целью разделения по молекулярным массам гель-фильтрацию проводили с малыми объемами материала.

На колонку с ультрагелем АсА-34, уравновешенную 0,02М натрийфосфатным буфером pH 7,4, наносили раствор фермента (1,8 мл) и подвергали

Очистка L-лизин- α -оксидазы из *Trichoderma* sp.

Стадия очистки	Общий белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг	Выход, %	Степень очистки
Исходная культуральная жидкость	7 350	2 460	0,33	100	0
I	620	2 240	3,6	91	10,9
II	237	1 584	6,7	64,4	20,3
III	77,1	1 086	14,8	44,2	44,8
IV	19	551	29	22,4	87,9

гель-фильтрации в два приема (рис. 3).

Удельная активность после данной стадии составила 29 Е/мг.

Данные, полученные на всех четырех стадиях очистки L-лизин- α -оксидазы, суммированы в таблице.

Полученный в результате проведенной очистки фермент L-лизин- α -оксидаза оказался гомогенным по результатам диск-электрофореза и ультрацентрифугирования (рис. 4).

Таким образом, разработан усовершенствованный метод выделения и очистки нового антиопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы из отечественного штамма *Trichoderma* sp. Метод очистки включает 4 ста-

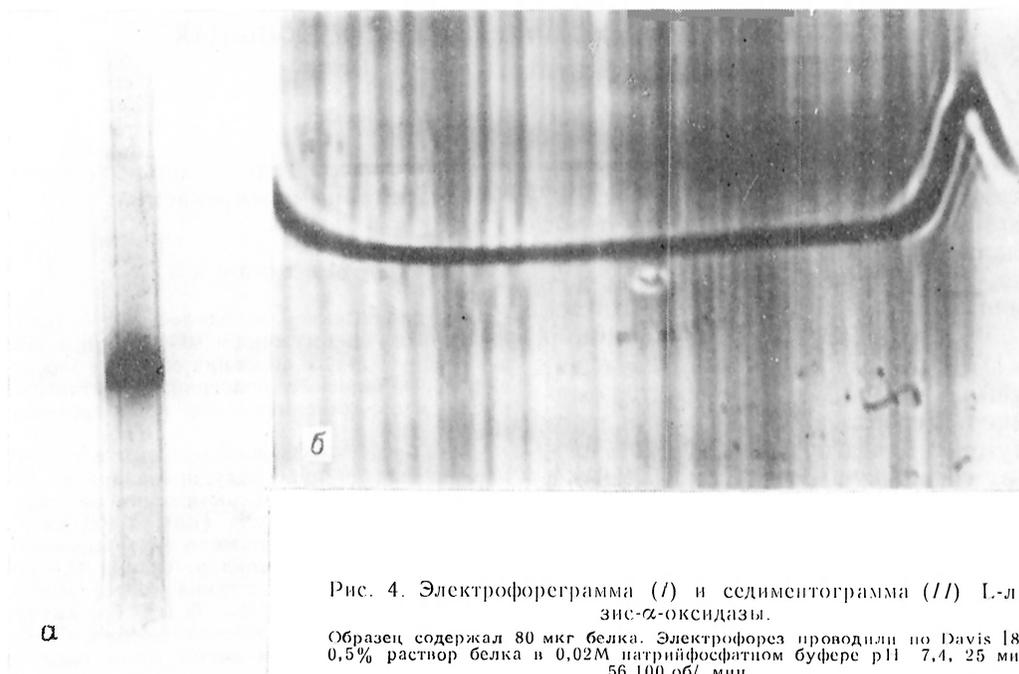


Рис. 4. Электрофореграмма (I) и седиментограмма (II) L-лизин- α -оксидазы.

Образец содержал 80 мкг белка. Электрофорез проводили по Davis [8]. 0,5% раствор белка в 0,02М натрийфосфатном буфере pH 7,4, 25 мин. 56 100 об/мин.

дин (вместо 6, использованных ранее) и дает хороший выход — 22,4%. Изучены физико-химические (оптимум pH, субстратная специфичность, константа Михаэлиса, молекулярная масса и др.), а также антиопухолевые свойства гомогенного фермента, что будет предметом отдельного сообщения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т. Т. — Вестн. АМН СССР, 1984, № 8, с. 11—24.
2. Березов Т. Т. — Там же, 1971, № 11, с. 35—46.
3. Брюле Ж., Экхардт С. Дж., Холл Т. К., Уинклер А. Лекарственная терапия рака. М., 1974.
4. Березов Т. Т. — В кн.: Роль аспарагиназы в энзимотерапии опухолей. М., 1972, с. 5—37.
5. Смирнова И. П., Хадыев С. Х. — Микробиология, 1984, т. 53, № 1, с. 163—164.
6. Capizzi R. L. — Cancer Chemother. Rep., 1975, v. 6, p. 37—39.
7. Cooney D. A., Handschumacher R. E. — Ann. Rev. Pharmacol., 1970, v. 10, p. 421—425.
8. Davis B. J. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, v. 121, p. 404—407.
9. Kusakabe M., Kodama K., Kuninaka A. et al. — J. biol. Chem., 1980, v. 255, p. 976—981.
10. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A. et al. — Agric. Biol. Chem., 1980, v. 44, p. 387—392.

11. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L. et al. — J. biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265—275.
12. Masborn L. T., Wriston J. C. — Arch. Biochem., 1964, v. 105, p. 105—106.
13. Patterson M. K., Orr G. R. — Cancer Res., 1969, v. 29, p. 1280.
14. Rutter D. A., Wade H. E. — Brit. J. exp. Path., 1971, v. 52, p. 610—611.
15. Struck J., Sizer J. W. — Arch. Biochem., 1960, v. 90, p. 22—30.
16. Uren J. R., Handschumacher R. E. — In: Cancer A Comprehensive Treatise./ Ed. F. F. Becker. New York, 1977, v. 6, p. 460—471; 477—480.

Поступила 02.10.84

ISOLATION AND PURIFICATION OF L-LYSYL- α -OXIDASE FROM *TRICHODERMA* sp.

S. Kh. Khaduev, E. V. Lukashova,
I. P. Smirnova, T. T. Berezov

Department of Biochemistry, P. Lumumba People's Friendship University, Moscow

An improved and relatively rapid procedure is developed for isolation and purification of a new antitumor enzyme L-lysyl- α -oxidase from *Trichoderma* sp. The method involves four steps, instead of six steps described previously, with a yield of 22.4%. The purified enzyme preparation was homogeneous as shown by polyacrylamide gel disc electrophoresis and ultracentrifugation. Physicochemical and antitumor properties of the enzyme are under study.

УДК 616-056.257-092:616-008.938.57

И. А. Фролова, Е. А. Бюл, Ю. П. Попова

НАРУШЕНИЯ ПУРИНОВОГО ОБМЕНА У БОЛЬНЫХ АЛИМЕНТАРНЫМ ОЖИРЕНИЕМ

Институт питания АМН СССР, Москва

В настоящее время растет число людей с повышенным содержанием в крови мочевой кислоты (МК), чему способствуют избыточное питание, потребление алкоголя, гиподинамия. Частота гиперурикемии (ГУ) среди взрослых достигает 5—25% [24, 27, 29], частота подагры — 2% [11, 29]. К заболеваниям, тесно связанным с ГУ и подагрой, относятся ожирение и атеросклероз [24]. Атеросклероз сопутствует подагре и ГУ в 10—20% случаев, гиперлипипротендемия (ГЛП) — в 40—100%, ожирение — в 70% [21], хотя механизмы связи нарушений пуринового обмена с таковым липидов нельзя считать выясненными.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении состояния пуринового обмена и влияния на него редукции из-

быточной массы тела у больных обменно-алиментарным ожирением.

Методика

Под наблюдением находилось 198 больных ожирением — 90 мужчин и 108 женщин в возрасте 25—60 лет. У 40 из них основное заболевание сочеталось с подагрой, у остальных имела место бессимптомная гиперурикемия (БГУ).

В течение 30—35 дней больным в стационаре назначали курс редуцированной по калорийности диеты для достижения редукции избыточной массы тела (1200—1800 ккал). В диете было резко снижено содержание моносахаридов и дисахаридов, ограничено содержание жира и холестерина (последнего — до 300 мг). 50% квоты белка составляли белки растительного происхождения. Содержание пуриновых оснований было снижено до 100 мг в день.